

D5

16

22 MAI 2000

EK/KBN

22.05.00

E13836

DIR 0549 PCT/skv

1)

DUPHAR INTERNATIONAL RESEARCH B.V.

Patent Dept. C.J. van Houtenlaan 36,

NL-1381 CP Weesp,

Nederland

og

2)

UNIVERSITEIT VAN GRONINGEN

Broerstraat 5, NL-9712 CP Groningen,

Nederland

PATENTSTYRET

00-05-19*20002613

22

Oppfinnere:

Etienne AGSTERIBBE

Duphar International Research B.V.,

C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp,

Rudi BRANDS

Duphar International Research B.V.,

C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp,

Lolke DE HAAN,

Duphar International Research B.V.,

C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp,

Gustaaf Johan Marie SCHARRENBURG

Duphar International Research B.V.,

C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp,

Willem Ronald VERWEIJ,

Duphar International Research B.V.,

C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp,

Jan Christiaan WILSCHUT

Duphar International Research B.V.,

C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp,

alle Nederland**Vaksiner med en LTB-adjuvant**

Foreliggende oppfinnelse vedrører en vaksine som inneholder B-subenhetene av varmelabilt enterotoksin (LTB) fra *Escherichia coli* (*E. coli*) som en mukøs immunadjuvant. Oppfinnelsen vedrører spesielt en vaksine av denne typen for å forhindre influensainfeksjoner hos mennesker. Imidlertid er oppfinnelsen ikke begrenset til bruk mot influensa.

Det er formålet med vaksiner mot infeksjøs sykdommer å hindre - eller i det minste begrense - infeksjon av det vaksinerte individet ved å stimulere en immunrespons mot det infeksjøs midlet gjennom introduksjon av en antigenformulering avledet fra det spesielle patogenet. Ideelt skal den induerte immunresponsen bestå av to komponenter, en humoral respons (produksjon av antigenspesifikke antistoffer) og en cellulær respons (dannelsen av spesifikke cytotoksiske T-lymfocytter som er istand til å eliminere celler infusert av patogenet).

Mange vaksinasjonsprosedyrer involverer administrering av en formulering som inneholder inaktiverte eller attenuerte hele patogen. Imidlertid er det for visse patogener en betraktelig ulempe å vaksinere med hele patogenet siden slike fremstillinger, selv når de er svært immunogene, kan ha uønskede bivirkninger. Dette forklarer den nåværende trenden mot anvendelse av veldefinerte subenhetvaksiner eller syntetiske vaksiner, som i det vesentlige mangler tilleggsbivirkninger av det hele infeksjøs midlet. Sammenlignet med hele patogenet, er imidlertid subenhetsvaksiner eller syntetiske vaksiner ofte ikke svært immunogene, i hvertfall i fravær av et tilsatt adjuvant.

Adjuvanter er substanser eller materialer administrert sammen med antigenet for å stimulere immunresponsen mot dette antigenet. Det er et behov for egnede adjuvanter som kan reise immunresponsen mot subenhetantigener eller syntetiske antigener, uten å forårsake uønskede bivirkninger.

Influensavaksineformuleringer har forekommet i lang tid, og i noen tilfeller inneholder de fortsatt inaktiverte eller attenuerte, hele virus. Slike formuleringer kan ha betraktelige bivirkninger; for det meste feber og reaksjoner på injeksjonsstedet. For tiden blir vaksinasjon vanligvis gjort med en subenhetsformulering. Denne subenhetsvaksinen forårsaker mindre bivirkninger, inneholder bare to hovedoverflateantigener av viruset, hemagglutinin (HA) og neuraminidase (NA), i en mer eller mindre renset form. I de fleste nåværende vaksineformuleringer er det ikke tilsatt adjuvant.

Den inaktiverte eller attenuerte hele influensavirusvaksinen så vel som subenhetsvaksinen, blir vanligvis administrert via en enkel intramuskulær (i.m.) injeksjon. Beskyttelsen mot influensainfeksjon, oppnådd ved begge vaksinasjonsprosedyrer, er sammenlignbar lav, spesielt hos eldre mennesker. Den relativt lave effektiviteten av vaksiner mot influensa skyldes delvis den høye antigenvariabiliteten til virus. Imidlertid har man grunn til å tro at beskyttelsen mot influensainfeksjon ved vaksiner kan forbedres ved stimulering og/eller modifisering av immunresponsen mot antigenet.

I tilfelle av influensa, eller generelt i tilfeller hvor infeksjonen oppstår via respiratorveien, skulle strategier for forbedret vaksinerings effektivitet rettes mot generasjonen av ikke bare en adekvat T-celle-avhengig IgG-respons i sirkulasjon, men også mot en lokal immunrespons (sekretoris IgA) til lungene og neshulen som et første mål for beskyttelse mot invaderende infeksiose virus. Dessuten kan en cellulær immunrespons (cytotoksiske T-celler) også være viktige, spesielt i å begrense infeksjonen. Det har blitt vist at administrering av influensavaksine via i.m.-injeksjon (den nåværende måten for administrering) ikke resulterer i en lokal IgA-respons i respirasjonsveien.

Foreliggende oppfinnelse vedrører det overraskende funnet at tilstedeværelse av LTB i en intranasal vaksineformulering ikke bare stimulerer IgG-responsen i sirkulasjonen relativt til i.m. immunisering med adjuvantfri immunogenvaksine, men også danner en lokal IgA-respons i respirasjonsveien.

Det intakte varmelabile enterotoksinet (LT) og dets nære slektning koleratoksin (CT) er sammensatt av en A-subenhet og en pentamerisk ringstruktur som består av fem identiske B-subenheter. A-subenheten har enzymatisk, ADP-ribosylering, aktivitet og viser toksisk aktivitet overfor toksinene. I tarmepitelet induserer A-subenheten en vedvarende syntese av "second messenger" cAMP, som resulterer i overskudd av elektrolytt og ledsagende væskesekresjon til lumen i tarmen.

LT og CT er kraftfulle mukøse immunogener. Ved lokal mukøs administrering gir disse molekylerne ikke bare opphav til induksjon av en systemisk antistoffrespons rettet mot toksinet, men også til produksjon av lokalt sekreterte antistoffer, spesielt sekretorisk IgA (S-IgA). LT og CT er også kraftfulle mukøse immunoadjvanter. Det betyr at når den blir sam-administrert med et ubeslektet annet immunogen, kan LT eller CT stimulere det systemiske og den mukøse antistoffresponsen mot immunogenet. Imidlertid har toksisiteten til LT og CT så langt essensielt utelukket anvendelse av LT eller CT i humane vaksineformuleringer.

I forsøk på å separere de toksiske fra de immunstimulatoriske aktivitetene til LT eller CT, har detoksifiserte mutanter fra toksinene eller den umodifiserte isolerte pentamere B-subenheten (LTB eller CTB, respektivt) blitt undersøkt for deres immunoadjuvantaktivitet. Fordi den toksiske ADP-ribosyleringsaktiviteten til toksinene er i A-subenheten, er tilstedeværelsen av til og med spormengder av umodifisert A-subenhet eller fra LT eller CT holotoksin i en human vaksine, svært uønsket.

Anvendelse av LTB som et adjuvant for influensa-antigener har blitt undersøkt ved
 10 Tamura og medarbeidere (Hirabashi et al.; Vaccine 8: 243-248 [1990]; Kikuta et al.; Vaccine 8: 595-599 [1990]; Tamura et al. J. Immunologi 3: 981-988 [1992]; Tamura et al.: Vaccine 12: 419-426 [1994]; Tamura et al.: Vaccine 12: 1083-1089 [1994]). I disse studiene, basert på anvendelse av løste influensavirushemagglutinin (HA) vaksine, ekstrahert og rensset fra influensavirus ved behandling med Tween/eter ifølge Davenport et al., (J. Lab. & Clin. Med. 63(1): 5-13 [1964]), ble det etablert at LTB, fritt for A-subenhet, mangler mukøs immunoadjuvantaktivitet når det blir administrert intranasalt sammen med oppløselige HA-antigen i mus. Det ble ytterligere demonstrert at tilstedeværelsen av spormengder av holotoksin, for eksempel residuelt holotoksin som var gjenstående i B-subenhetfremstillinger isolert fra holotoksin, gjenoppretter ekspresjonen av
 15 adjuvantaktivitet fra LTB mot oppløselige HA-antigener. Mer spesielt, når LTB fra rekombinante kilder (og derfor fullstendig fritt for til og med den minste spormengden av A-subenhet) ble brukt, ble en spormengde av holotoksin tilsatt for at LTB skulle utvise mukøs aktivitet ved intranasal sam-administrering med det oppløselige HA-antigenet.
 20
 25 Overraskende ble det funnet at isolert LTB fra rekombinant opprinnelig, og derfor fullstendig fri for A-subenhet, utviser kraftig immunoadjuvantaktivitet avhengig av egen-skapen eller presentasjonsformen til det intranasale sam-administrerte immunogenet.

For eksempel, adjuvantaktivitet mot fritt blandet småoppløse antigener, slik som ovalbumin eller oppløselig ectodomen fra kappeglykoproteinet til humant immunodefekt virus (gp 120), er lav og ofte udekkerbar. På den annen side er det funnet at LTB utviser svært kraftfull adjuvantaktivitet mot fritt blandede store aggregater eller spesielt immunogener. Disse immunogener inkluderer influensavirusenhetantigen og "keyhole limpet" hemocyanin (KLH).

Av den grunn angår foreliggende oppfinnelse en vaksine som inneholder minst ett partikulært immunogen og en adjuvantmengde av LTB fullstendig fri for A-subenhet eller toksisk LT-holotoksin.

- 5 Som definert heri, betyr "partikulær" enhver assosiering av virale, bakterielle eller fungale antigener karakteristisk for de respektive mikro-organismer. Mer spesielt omfatter betegnelsen "spesielt immunogen" aggregater, clustere, miceller, virosomer, rosetter, viruslignende immunogenpartikler og dets like.
- 10 I vaksinen ifølge foreliggende oppfinnelse, kan spesielt LTB fremstilt fra rekombinant DNA-teknologi bli benyttet. Immunogenet eller immunogenene kan bli avledet fra infektive midler, slik som virus eller bakterier.

- Vaksiner som passer til den ovenfor nevnte beskrivelsen ble funnet ikke bare å induere systemisk immunoglobulin (for eksempel IgG) mot immunogenet ved mukøs (for eksempel intranasal) administrering, men det er også funnet å induere lokal sekresjon av IgA.
- 15

- Denne siste egenskapen er spesielt nyttig for immunisering mot sykdommer som blir overført ved mukøs infeksjon med virus (slik som influensavirus, herpesvirus, papillomavirus) eller bakterier (som *Chlamydia*, pneumococs) eller sopp.
- 20

- En spesiell fordel for mukøs administrering er den enkle vaksineanvendelsen, som dessuten overvinner potensiell nåleredsel ved vaksiner hos de som mottar en intramuskulær immunisering.
- 25

- Skjønt for eksempel i tilfelle av influensainfeksjon, er høyt serum IgG-titere viktige for spredning av systemisk spredning av viruset og beskyttelse av lungene mot infeksjon, og lokale S-IgA-antistoffer er viktige som et førstelinje-forsvar for beskyttelse av den øvre luftvei.
- 30

- Det har blitt rapportert av muskøs vaksinerings ved intranasal administrering av inaktiverte influensavirus i fravær av en mukøs adjuvant, ikke var vellykket (Clancy: *Drugs* 50: 587-594 [1995]; Katz et al.; *J. Infect. Dis.* 175: 352-369 [1997]), antagelig på grunn av direkte administrering av et antigen til det mukøse vevet som ikke resulterer i en S-IgA-respons. Sam-administrering av en mukøs adjuvant ser ut til å være en forløper til å induere en lokal immunrespons mot et immunogen. Bemerkelsesverdig ble det funnet
- 35

at ved intranasal immunisering ifølge foreliggende oppfinnelse, ble det såkalte vanlige mukøse immunsystemet aktivert, hvilket resultere i sekresjon av S-IgA ikke bare på stedet for anvendelsen (intranasalt), men også i mer fjernt mukøst vev (for eksempel i vaginalt muskøst vev).

5

Vaksiner ifølge foreliggende oppfinnelse kan inneholde immunogener av for eksempel viral eller bakteriell opprinnelse slik som bakterielle antigener, virale subenheter (eventuelt inaktiverte) splittvirus (eventuelt inaktiverte) inaktiverte virus eller bakterier, eller attenuerte (for eksempel kuldeadapterte) levende virus i en spesiell form.

10

LTB brukt ifølge foreliggende oppfinnelse er fullstendig fritt for toksisk LTA eller toksisk holotoksin. Fortrinnsvis blir LTB fremstilt ved rekombinant DNA-teknologi. Fritt for toksisk LTA i foreliggende oppfinnelses kontekst, betyr fullstendig LTA-fritt.

15

I vaksinene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan LTB blir brukt fritt blandet med det spesielle antigenet – en kovalent kobling mellom antigenet og adjuvanten kan bli etablert, imidlertid er det ikke noe behov for å oppnå adekvat adjuvanteffekt.

20 Bortsett fra LTB og én eller flere immunogener, kan vaksinen ifølge foreliggende oppfinnelse inneholde et vandig oppløsningsmiddel, spesielt en buffer, mer spesielt PBS (fosfatbufret saltvann) så vel som en stabilisator (f.eks PEG eller metylcellulose) og/eller glukose.

25 Komponentene i vaksinen ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli frysetørket eller være i en flytende form.

Vaksinen ifølge foreliggende oppfinnelse kan være for eksempel i bulk, i en ampulle eller i en sprøyte, eller i en forstøvningsinnretning.

30

Vaksinen ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli administrert subkutan, intramuskulært eller intrabronkialt, eller intranasal eller intravaginal applisering eller pr. os.

35

EKSEMPEL 1

Fremstilling av rekombinant LTB og influensasubenhets-antigen

5

Rekombinant LTB

Rekombinante LTB-gener og rekombinante LTB-molekyler som nevnt i foreliggende oppfinnelse, kan bli avledet fra genene som koder for LT-I-molekyler fra for eksempel en svine- eller en human kilde. Svine LT (pLT) genet ble subklonet i pUC18 vektor
 10 (Vieira og Messing: *Gene* **19**: 159-268 [1982] ved å bruke PCR-teknikker (DeHaan et al.; *Vaccine* **14**: 260-266 [1996]) EWD299 vektor, opprinnelig beskrevet av Dallas et al. (*J. Bacteriol.* **139**: 850-858 [1979] ble brukt som et templat i PCR-reaksjonen. Den primære pLT-sekvensen fra denne konstruksjonen ble funnet å være nøyaktig i samsvar med den primære pLT-sekvensen som var inngitt i EMBL-sekvensdatabanken, som
 15 verifisert ved DNA-sekvensering. Fra pUC18-pLT-konstruksjonen ble pLTB-genet subklonet inn i pPROFIT ekspresjonsvektoren, som inneholder en temperaturinduserbar λ PR-promoter (van der Linden et al.: *Eur. J. Biochem.* **204**: 197-202 [1992]).

E. coli MC1061 ble brukt som en vertsstamme for pPROFIT-plasmidkonstruksjonene.
 20 Bakterier ble dyrket i Luria-Bertani-medium inneholdende 50 μ g av kanamycin pr. ml. Induksjon av pLTB-ekspresjon ble ervervet ved å heve kulturtemperaturen til log-fase MC1061 kulturer som bærer pPROFIT-LTB vektoren fra 28 til 42°C som beskrevet av De Haan et al. (*supra*).

25 pTLTB, en pKK-avledet ekspresjonsvektor (Pharmacia Ltd.) som koder for human LTB (dvs. et LTB-gen avledet fra et LTB-gen isolert fra en *E. coli* bakterie enterotoksigen i mennesker) ble ervervet fra Tamura og medarbeidere. DNA-sekvensering ga 3 aminosyresubstitusjoner i det modne humane LTB (hLTB) sammenlignet med pLTB (Thr4 til Ser, Glu46 til Ala, og Lys102 til Glu). *E. coli*-
 30 stammen JM101 ble brukt som en vert for pTLTB. Bakterier ble dyrket i LB-medium inneholdende 100 μ g ampicillin pr. ml. Induksjon av hLTB-ekspresjon ble ervervet ved tilsetning av IPTG til log-fasekulturer fra JM101 som bærer pTLTB til en endelig konsentrasjon på 5 mM.

35 For rensning av pLTB og hLTB ble overekspresserende bakterier festet og deretter lysert ved sonikering. Deretter ble celledetritus fjernet ved ultrasentrifugering. Uforedlede celle-ekstrakter inneholdende rekombinant pLTB eller hLTB ble

- deretter anvendt på en immobilisert D-galaktose (Pierce) kolonne. Etter utstrakt vasking ble rekombinant rensset pLTB eller hLTB ervervet ved eluering med D-galaktose som tidligere beskrevet av Uesaka et al. (Microb. Path. 16: 71-76 [1994]). Både rekombinant pLTB og hLTB ble funnet å bibeholde optimale GM1-bindingsegenskaper i en GM1 oppfangings ELISA, som beskrevet tidligere. (DeHaan et al.: Vaccine 14: 260-266 [1996]). Kolonnefraksjoner inneholdende rensset protein, dialisert mot PBS og lagret ved 4°C.

Influenza-subenhetsantigen

- Influenza-subenhetsantigenet ble fremstilt fra B/Harbin/7/94 virus (B/Harbin) eller A/Johannesburg/33/94 (A/Johannesburg) dyrket på embryonerte kyllingegg ifølge metoden beskrevet av Bachmayer et al. (patent-beskrivelse GB 1.498.261, 18, januar 1978) og av Chaloupka et al. (Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. 15: 121-127 [1996]). Denne metoden omfatter trinnene for behandling av de formaldehyd-inaktiverede virus med en egnet kationisk detergent, separering av de frigitte antigener (hemagglutinin og neuraminidase) fra den virusresiduale kjerne. Denne metoden fører til partikulære, dvs. micellelignende eksponering av antigenene etter fjerning av detergenten.
- Potensialet til subenhetsantigenfremstillingene, uttrykt som µg pr. ml., ble bestemt i en enkel radial diffusjonstest i overensstemmelse med Wood et al. (J. Biol. Stand. 5: 237-241 [1977]).

25

EKSEMPEL 2

Systemisk antistoffrespons til influensa-subenhetsvaksine

- Grupper på fire mus ble immunisert i.n. uten anestesi med 5 µg influensa-subenhetsantigen avledet fra enten B/Harbin eller A/Johannesburg-virus fremstilt ifølge metoden beskrevet i EKSEMPEL 1. Antigenet ble gitt enten alene (HA) eller sammen med 2,0 µg pLTB (pLTB), i alle tilfeller i et volum på 20 µl på dagene 0, 7 og 14. Kontrollmus mottok det samme volum med PBS. Musene ble avlivet på dag 28. Serum IgG-antistoffrespons ble bestemt i en direkte ELISA.

35

Figur 1 viser de observerte serum IgG-antistoffresponsene mot HA B/Harbin (hele søyler) og HA A/Johannesburg (åpne søyler).

Nasal administrering av subenhet-antigenet uten adjuvant ga en dårlig systemisk antistoffrespons, mens supplerings av subenhetantigenet med pLTB forsterket serumantistoffresponsen med mer enn to størrelsessordner. Forskjellene mellom responsene til mus immunisert med B/Harbin og A/Johannesburg var ikke signifikant.

Disse resultatene viser at ikke-toksisk pLTB er en kraftig adjuvant som er istand til å indusere høy-systemiske antistoffresponser mot i.n. administrert influensa-subenhetantigen.

15

EKSEMPEL 3

Sammenligning av systemisk antistoffresponser med humant og svine-LTB

20

Grupper på 4 mus ble immunisert i.n uten anestesi med 5 µg influensa-subenhetantigen avledet fra B/Harbin-influenzavirus fremstilt ifølge metoden beskrevet i EKSEMPEL 1.

Antigenet ble gitt enten alene (INGEN) eller sammen med enten 2,0 µg pLTB (pLTB) eller 2,0 µg hLTB (hTLB), i alle tilfeller i et volum på 20 µg på dagene 0, 7 og 14. Kontrolldyrene mottok PBS. Musene ble avlivet på dag 21. Serum IgG-antistoffrespons ble bestemt i en direkte ELISA på dag 21.

Figur 2 viser den observerte serum IgG-antistoffresponsen mot HA B/Harbin. Nasal administrering av subenhetantigen uten adjuvant ga igjen en dårlig systemisk antistoffrespons, mens supplerings med subenhetantigen med pLTB og med hLTB, forsterket serumantistoffresponsen til det samme nivået til mer enn to størrelsessordner. De observerte forskjellene mellom pLTB og hLTB behandlede dyr, var ikke-signifikant.

35

EKSEMPEL 4

Induksjon av lokal mukosal antistoffrespons til influensa-subenhetsvaksine

5 For å undersøke evnen til pLTB å fremkalle influensa HA-spesifikke S-IgA-responser, ble nasale utskyllinger av musene fra EKSEMPEL 2 analysert for tilstedeværelse av influensa-spesifikke IgA-antistoffer. Nasale utskyllinger ble ervervet ved å skylle 0,5 ml PBS retrograd via nasofarynx til den øvre del av lufttrøret,
10 skylle tilbake og samle utskyllingsvæsken i neseborene.

Resultatene er vist i figur 3.

Dataene viser at rekombinant pLTB-induserte sterke lokale S-IgA-responser mot
15 HA. De to forskjellige influensa-subenhetantigene ga like resultater.

EKSEMPEL 5

20

Sammenligning av mukøse antistoffresponser med humane og svine-LTB

For å sammenligne kapasiteten til pLTB og hLTB for å forsterke nasale HA-spesifikke antistoffresponser, ble nasale utskyllinger av musene fra EKSEMPEL 3
25 tatt som beskrevet ovenfor, og analysert for tilstedeværelse av HA-spesifikk S-IgA på dag 21. Figur 4 viser at både pLTB og hLTB induserte raske nasale HA-spesifikke antistoffresponser. Dessuten ble responsene ervervet med pLTB og hLTB sammenlignet i størrelsesorden, hvilket viser at begge molekylene har sammenlignbare adjuvante egenskaper.

30

EKSEMPEL 6

**Induksjon av genital muskøs antistoffrespons
til influensa-subenhetsvaksine påført i.n.**

- 5 For å undersøke evnen til rekombinant pLTB å fremkalle influensa HA-spesifikke S-IgA-responser på mukøse steder andre enn stedet for administrering, ble induksjonen av influensaspesifikke S-IgA-antistoffer i den genitale trakt etter i.n.-immunisering i musene fra EKSEMPEL 2, undersøkt. Utskillingen fra den urogenetiale trakt ble utført ved å introdusere og dra tilbake et 100 µl volum av PBS 10 ti ganger inn i vagina ved å bruke en pipettespiss. Mukøse utskyllinger ble lagret ved 4°C inntil bestemmelse av deres IgA-innhold ved ELISA. Resultatene er vist i figur 5.
- 15 Resultatene viser at pLTB viste seg å være effektive i å inducere S-IgA-responser ved dette fjerntliggende mukøse stedet. Både B/Harbin og A/Johannesburg-antigen responderte like godt.

20

EKSEMPEL 7

Kinetikker av IgG-respons

- 25 Fire grupper på åtte hunn-BALB/c-mus (6-8 uker) ble hver behandlet som følger:

<u>Kontroll</u>	behandlet med PBS uten antigen. 20 µl i.n. uten anestesi på dagene 0, 7 og 14.
<u>pLTB</u>	5 µg HA og 2,0 µg rekombinant pLTB i 20 µl påført i.n. uten anestesi på dagene 0, 7 og 14.
<u>HA s.c.</u>	5 µg HA i 100 µl påført subkutan uten anestesi på dag 0
<u>Rekonv.</u>	Rekonvalesente mus, dvs. mus infisert med 10^8 infektive enheter av PR ⁸ -virus i 20 µl påført intranasalt uten anestesi på dag 0.

- 35 Fra fire mus i hver gruppe ble blodprøver tatt fra halevenene på dag 6, 13 og 20. Dessuten ble musene avlivet på dag 28, og blodprøve ble tatt. I hver prøve ble serum IgG målt ved ELISA.

Resultatene er vist i figur 6. Søylen (fra venstre til høyre) for hver av vaksinasjonsregimene representerer IgG-titrene på dagene 6, 13, 20 og 28, respektivt. Disse resultatene viser at etter intranasal vaksineringsregime blir IgG-induskjonen minst i samme størrelsesorden som etter subkutan vaksineringsregime med HA alene, eller som i rekonvalesente mus.

10 EKSEMPEL 8

Nasale og lungemukosale antistoff

De samme musene som ble studert i EKSEMPEL 7, gjennomgikk mukøse utskyllinger av nesehulen og den urogenitale trakt etter å ha blitt avlivet på dag 28 som beskrevet ovenfor.

Disse resultatene er oppsummert i figur 8. De skraverte søylene representerer data fra nasalskylningene og de uskraverte søylene viser data fra vaginale skyllinger.

Resultatene indikerer at titeren av den første linje av forsvarsantistoffer (S-IgA) ved intranasal vaksineringsregime med HA/pLTB er minst av samme størrelsesorden som S-IgA-titeren hos rekonvalesente mus, mens (klassisk) subkutan vaksineringsregime med HA ikke fører til en detekterbar mukøs IgA-titer.

30 EKSEMPEL 9

Beskyttelse av vaksinerte mus mot antigen-utfordring

Fire mus i hver av gruppene fra EKSEMPEL 7 ble infisert på dag 28 med 5×10^6 infektiøse enheter av PR8-virus intranasalt i 20 µl uten anestesi.

Tre dager etter infeksjonen ble virusmengden i nese og lunger bestemt.

Virustitreringen i nese- og lungehomogenater ble utført på MDCK-celler som ble dyrket på EPISERF (Life Technologies, PAISLY, Scotland) i mikrotiterplater i totrinns fortynninger, og deretter endepunkt-bestemmelse ved å bruke haemagglutineringsreaksjon med marssvin-erythrocytter.

5

Resultatene er oppsummert i figur 7. De skraverte søylene representerer virustitrene i nesen og de uskraverte søylene er for lungene. Virustitrene i lungene for rekonvalesente mus og ved vaksinerings med pLTB, var ubetydelige, derfor viser disse data at ved å bruke pLTB som et mukøst adjuvant, er beskyttelsen mot influensasinfeksjon fullstendig.

10

P a t e n t k r a v

1.

5 Vaksine for mukøs administrering, k a r a k t e r i s e r t v e d
at den inneholder minst ett partikulært immunogen og en adjuvantmengde av B-sub-
enheter til varmelabilt enterotoksin (LTB) karakteristisk for *E. coli.*, fullstendig fritt for
A-subenhet eller toksisk LT-holotoksin.

2.

10 Vaksine ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at LTB blir
fremstilt ved rekombinante DNA-metoder.

3.

15 Vaksine ifølge krav 1-2, k a r a k t e r i s e r t v e d at virale
eller bakterielle eller fungale antigener blir brukt som et immunogen.

4.

20 Vaksine ifølge krav 1 til 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at im-
munogenet tilveiebringer immunisering mot en sykdom som blir overført ved mukøs
infeksjon.

5.

25 Vaksine ifølge krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at influensa-
antigener blir brukt som et immunogen.

6.

30 Fremgangsmåte for induksjon av en systemisk immunoglobulinrespons mot et immuno-
gen, k a r a k t e r i s e r t v e d mukøs administrering av nevnte
immunogen i en partikulær form og en adjuvantmengde av B-subenheter fra varmela-
bil enterotoksin karakteristisk for *E. coli*, fullstendig fri for a-subenhet eller toksisk LT-
holotoksin.

7.

35 Fremgangsmåte for å indusere en vanlig mukøs immunrespons mot et immunogen,
k a r a k t e r i s e r t v e d ved mukøs administrering av nevnte
immunogen i en partikulær form og en adjuvantmengde av B-subenheter av varmelabilt

enterotoksin karakteristisk for *E. coli*, fullstendig fritt for a-subenhet eller toksisk LT-holotoksin.

8.

- 5 Anvendelse av B-subenheter fra varmelabil enterotoksin (LTB), karakteristisk for *E. coli*, fullstendig fri for A-subenhet eller toksisk LT-holotoksin i fremstillingen av en vaksine som omfatter et partikulært immunogen og en adjuvantmengde av nevnte LTB egnet for induksjon av en systemisk immunoglobulinrespons mot nevnte immunogen i et individ ved mukøs administrering.

10

9.

- Anvendelse av B-subenheter av varmelabil enterotoksin (LTB), karakteristisk for *E. coli*, fullstendig fri for A-subenhet eller toksisk LT-holotoksin i fremstillingen av en vaksine som omfatter et partikulært immunogen og en adjuvantmengde av nevnte LTB,
15 egnet for induksjon av en vanlig mukøs immunrespons mot nevnte immunogen i et individ ved lokal mukøs administrering.



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 39/39 // 39:145	A1	(11) International Publication Number: WO 99/26654 (43) International Publication Date: 3 June 1999 (03.06.99)
(21) International Application Number: PCT/EP98/07553 (22) International Filing Date: 24 November 1998 (24.11.98) (30) Priority Data: 97203671.9 25 November 1997 (25.11.97) EP (71) Applicants (for all designated States except US): DUPHAR INTERNATIONAL RESEARCH B.V. [NL/NL]; Patent Dept., C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL). UNIVERSITEIT VAN GRONINGEN [NL/NL]; Oude Boteringstraat 14, NL-7912 GL Groningen (NL). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): AGSTERIBBE, Etienne [NL/NL]; Duphar International Research B.V., C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL). BRANDS, Rudi [NL/NL]; Duphar International Research B.V., C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL). DE HAAN, Lolke [NL/NL]; Duphar International Research B.V., C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL). VAN SCHARRENBURG, Gustaaf, Johan, Marie [NL/NL]; Duphar International Research B.V., C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL). VERWEIJ, Willem, Ronald [NL/NL]; Duphar International Research B.V., C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL). WILSCHUT,		Jan, Christiaan [NL/NL]; Duphar International Research B.V., C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL). (74) Agents: BREEPOEL, Peter, Maria et al.; Octrooibureau Zoan B.V., C.J. van Houtenlaan 36, NL-1381 CP Weesp (NL). (81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>
(54) Title: VACCINES WITH AN LTB ADJUVANT (57) Abstract <p>The present invention relates to a vaccine containing at least one particulate immunogen and an adjuvanting amount of B subunits of heat-labile enterotoxin characteristic of <i>E. Coli</i>. More in particular, this invention relates to vaccines wherein the adjuvanting LTB is free from contaminating A subunits or holotoxin. To this end, preferably, use is made of LTB prepared by recombinant DNA techniques. The particulate immunogens can relate to or can be derived from e.g. viruses, bacteria or fungi. This vaccine is particularly suitable for the induction of a protective response against said particulate immunogen upon mucosal (e.g. intra-nasal) administration. It was found that such administration results in both systemic and mucosal protection against the pathogen to which the particulate immunogen relates.</p>		

This latter property is particularly favourable for immunisation against diseases which are transmitted by mucosal infection with viruses (such as influenza virus, herpes virus, papilloma virus) or bacteria (like *Chlamydia*, pneumococs), or fungi.

p. 4
1.19-21

- 5 A particular advantage of mucosal administration is the ease of vaccine application, which, furthermore, circumvents potential needlephobia with vaccinees receiving an intramuscular immunisation.

- 10 Although, for example in the case of influenza infection, high serum IgG titres are important for preventing systemic spread of the virus and protection of the lungs against infection, local S-IgA antibodies are crucial as a first line of defence for protection of the upper respiratory tract.

- 15 It has been reported that mucosal vaccination by i.n. administration of inactivated influenza virus in the absence of a mucosal adjuvant was not successful (Clancy: Drugs 50: 587-594 [1995]; Katz et al.; J. Infect. Dis. 175: 352-369 [1997]), probably because direct administration of an antigen to mucosal tissue will not result in an S-IgA response. Co-administration of a mucosal adjuvant seems to be a prerequisite to induce a local immune response against an immunogen. Remarkably, it was found
20 that by i.n. immunisation according to the present invention the so-called common mucosal immune system is activated which results in secretion of S-IgA not only at the site of application (i.n.) but also in distant mucosal tissues (e.g. in the vaginal mucosal tissue).

- 25 Vaccines according to the present invention may contain immunogens of e.g. viral or bacterial origin, such as bacterial antigens, viral subunits (optionally inactivated) split viruses (optionally inactivated) inactivated viruses or bacteria, or attenuated (e.g. cold-adapted) live viruses, in a particulate form.

p. 5
4.6-9

- 30 The LTB used according to the present invention is strictly free of toxic LTA or toxic holotoxin. Preferably, the LTB is prepared by recombinant DNA technology. Free of toxic LTA in the present context means strictly LTA-free.

In the vaccine according to the present invention the LTB can be used freely admixed with the particulate antigen - a covalent coupling between the antigen and the adjuvant can be established, however, is not needed to attain adequate adjuvant effect.

P.5
L. 16-18

5

Apart from LTB and one or more immunogens the vaccine according to the present invention may contain an aqueous solvent, in particular a buffer, more in particular PBS (phosphate-buffered saline) as well as a stabiliser (e.g. PEG or methyl cellulose), and or glucose.

10

The components of the vaccine according to the present invention may be freeze dried or in a liquid form.

15

The vaccine according to the present invention may be present e.g. in bulk, or in an ampoule, or in a syringe, or in a nebuliser.

20

The vaccine according to the present invention may be administered by subcutaneous, or intramuscular, or intra-bronchial, or intra-nasal or intra-vaginal application or per os.

EXAMPLE 1

PREPARATION OF RECOMBINANT LTB AND INFLUENZA SUBUNIT ANTIGEN

RECOMBINANT LTB

25 Recombinant LTB genes and recombinant LTB molecules, as mentioned in the present invention, may be derived from genes encoding LT-I molecules from e.g. a porcine or a human source. The porcine LT (pLT) gene was subcloned in the pUC18 vector (Vieira and Messing: Gene **19**: 259-268 [1982]) using PCR techniques (DeHaan et al.: Vaccine **14**: 260-266 [1996]). The EWD299 vector, originally
30 described by Dallas et al. (J. Bacteriol. **139**: 850-858 [1979]) was used as a template in the PCR reaction. The primary pLT sequence of this construct was found to be exactly in accordance with the primary pLT sequence as submitted in the EMBL sequence databank, as verified by DNA sequencing. From the pUC18-pLT construct,

GB 1 498 261 of January 18, 1978) and by Chaloupka et al. (Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. **15**: 121-127 [1996]). This method comprises the steps of treatment of the formaldehyde-inactivated viruses with a suitable cationic detergent, separation of the released antigens (hemagglutinin and neuraminidase) from the virus residual core.

- 5 This method leads to particulate, i.e. micelle-like exposition of the antigens after removal of the detergent.

The potency of the subunit antigen preparations, expressed as μg per ml, was determined in a single-radial diffusion test according to Wood et al. (J. Biol. Stand. **5**: 237-241 [1977]).

10

EXAMPLE 2

SYSTEMIC ANTIBODY RESPONSE TO INFLUENZA SUBUNIT VACCINE

- Groups of four mice were immunised i.n. without anaesthesia with 5 μg of influenza subunit antigen derived from either B/Harbin or A/Johannesburg virus prepared according to the method described in EXAMPLE 1. The antigen was given either alone (HA) or together with 2.0 μg of pLTB (pLTB), in all cases in a volume of 20 μl on days 0, 7 and 14. Control mice received the same volume of PBS. Mice were sacrificed on day 28. Serum IgG antibody response was determined in a direct
- 15
- 20 ELISA.

Figure 1 shows the observed serum IgG antibody responses against HA B/Harbin (solid bars) and HA A/Johannesburg (open bars).

- Nasal administration of the subunit antigen without adjuvant gave a poor systemic antibody response, whereas supplementation of the subunit antigen with pLTB enhanced the serum antibody response by more than two orders of magnitude. Differences between the responses of mice immunised with B/Harbin and A/Johannesburg were not significant.
- 25

- These results show that non-toxic pLTB is a powerful adjuvant capable of inducing high systemic antibody responses towards i.n. administered influenza subunit antigen.
- 30